

(19)



Eur päisches Patentamt

European Patent Office

Office européen d s brevets



(11)

**EP 0 757 055 A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
05.02.1997 Patentblatt 1997/06

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C07H 17/08**, A61K 31/70,  
C07C 62/32, C07C 62/34,  
C07C 69/757, A61K 31/19

(21) Anmeldenummer: 96110132.6

(22) Anmeldetag: 23.06.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV SI

(30) Priorität: 30.06.1995 CH 1930/95

(71) Anmelder: **Cerbios-Pharma S.A.**  
CH-6917 Barbengo (CH)

(72) Erfinder:  
• **Jaton, Jean-Claude**  
1226 Thonex (CH)

• **Marazza, Fabrizio**  
6986 Novaggio (CH)  
• **Lewenstein, Ari**  
8002 Zürich (CH)  
• **Sirotnak, Francis M.**  
New York 10028 (US)  
• **Jaun, Bernhard**  
8117 Fällanden (CH)

(74) Vertreter: **Blum, Rudolf Emil Ernst et al**  
c/o E. Blum & Co  
Patentanwälte  
Vorderberg 11  
8044 Zürich (CH)

### (54) **Neue Glykoside, deren zuckerfreie Abbauprodukte und Derivate derselben**

(57) Es werden neue Glycoside und deren zuckerfreie Abbauprodukte, sowie synthetisch hergestellte Derivate beschrieben, welche als Wirkstoffe von pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden können. Die neuen Glycoside sind aus den wässrigen Extrakten von Pflanzenpollen isoliert worden.

Diese neuen Glycoside, zuckerfreien Abbauprodukte und deren Derivate besitzen die Wirksamkeit, das Immunsystem von warmblütigen Tieren zu modulieren, und sie können als Wirkstoffe in pharmazeutischen Präparaten zur Behandlung von Tumoren und Viruserkrankungen eingesetzt werden.

**EP 0 757 055 A2**

Docket: AVMX-012/01US  
USSN: 09/976,929  
Ref. No. F4

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Glykoside, die aus dem wässrigen Extrakt von Pflanzenpollen isoliert wurden und ferner neue Aglykone, die nach der Abspaltung von Zuckerbestandteilen aus diesen Glykosiden erhalten wurden und Derivate der neuen Aglykone.

Die genannten neuen Verbindungen können beispielsweise als Wirkstoffe in pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden.

**BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK**

Verfahren zur Herstellung von Extrakten aus Pflanzenpollen sind seit langem bekannt, und es sei in diesem Zusammenhang beispielsweise auf die deutsche Patentschrift Nr. 1 467 750 und die österreichische Patentschrift Nr. 255 634 verwiesen, in denen Verfahren zur Herstellung von solchen Pollenextrakten beschrieben sind, die von den hochmolekularen Proteinen der Pollenhülle im wesentlichen befreit sind, welche möglicherweise Allergien hervorrufen können. Die entsprechenden, mit wässrigen Extraktionsmitteln, bzw. mit nicht wässrigen Extraktionsmitteln gewonnenen Pollenextrakte und auch Mischungen derselben, sind seit vielen Jahren im Handel erhältlich, und sie werden als Stärkungsmittel zur Erhöhung der Abwehrkräfte, zur Behandlung von Prostataleiden, zur Beschleunigung der Heilung von Wunden und Knochenbrüchen und als entzündungshemmende Mittel eingesetzt.

Ferner werden in der europäischen Patentschrift 201 053 Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur prophylaktischen Behandlung von Allergien beschrieben, das als Wirkstoff einen mit wässrigen Extraktionsmitteln oder mit nicht wässrigen Extraktionsmitteln gewonnenen entsprechenden Pollenextrakt enthält.

Des weiteren wurde auch bereits versucht, aus den von hochmolekularen Proteinen befreiten, mit wässrigen Extraktionsmitteln gewonnenen Pollenextrakte Fraktionen zu isolieren, die an Wirkstoffen angereichert sind. In der europäischen Patentschrift 220 453 und in der entsprechenden US Patentschrift 4 952 399, werden die von hochmolekularen Proteinen befreiten, mit wässrigen Extraktionsmitteln gewonnenen Pollenextrakte zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten eingesetzt, welche das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Gemäss diesen Patentschriften werden als Wirkstoff auch solche Fraktionen des Pollenextraktes eingesetzt, die an Aminosäuren und Peptiden und/oder proteinartigen Substanzen angereichert sind, bzw. Fraktionen, die ein Molekulargewicht von weniger als 750, beispielsweise im Bereich von 650-750, aufweisen.

Die dort beschriebenen Pollenextrakte, bzw. die aus den Pollenenextrakten isolierten Wirkstoff-Fractionen, weisen also eine cytostatische Wirksamkeit auf, d.h. das Wachstum von verschiedenen Krebszellen, wie z.B. Leukämiezellen und menschliche Prostatakrebszellen, Kehlkopfkrebszellen, Leberkrebszellen, Blasenkrebszellen und Brustkrebszellen, konnte in entsprechenden Zellkulturen stark gehemmt werden.

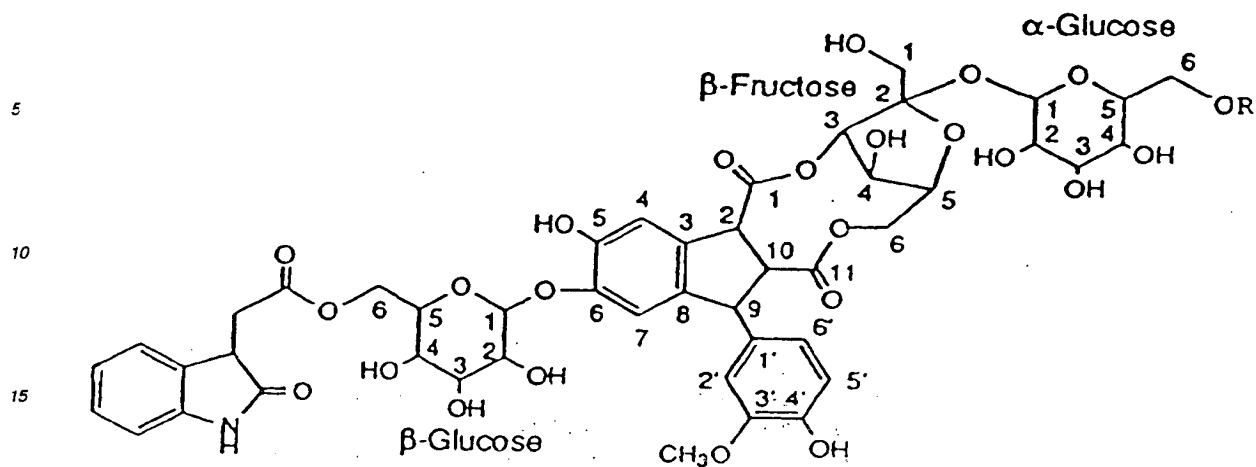
Weitere Arbeiten, die mit den wässrigen Extrakten von Pflanzenpollen durchgeführt wurden, führten jetzt überraschenderweise zur Isolierung von proteinfreien Wirkstoff-Fractionen, bzw. Wirkstoffen, welche Glycoside sind, bzw. Aglycone darstellen, die durch hydrolytische Spaltung der glycosidischen Wirkstoff-Fractionen erhalten wurden.

Ueberraschenderweise zeigte es sich ferner, dass diese neuen Wirkstoff-Fractionen, bzw. die durch deren Spaltung erhaltenen Aglycone sich bezüglich ihrer pharmazeutischen Wirksamkeit von den früher aus Pollen isolierten proteinhaltigen Wirkstoff-Fractionen unterscheiden.

Die neuen Wirkstoff-Fractionen, bzw. die daraus isolierten Wirkstoffe, bzw. synthetisch hergestellte entsprechende neue Wirkstoffderivate, weisen nämlich die Eigenschaft auf, die Immunreaktion warmblütiger Tiere zu modulieren.

**BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG**

Aus dem wässrigen Extrakt von Pflanzenpollen wurden jetzt neue Glycoside isoliert, welche die folgende Formel I

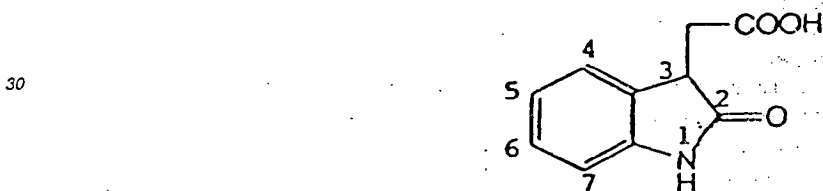


20 aufweisen.

In dieser Formel I bedeutet

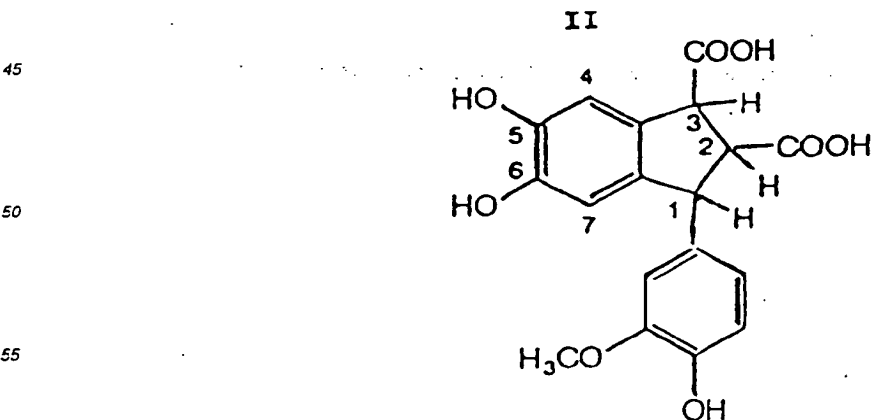
R ein Wasserstoffatom oder einen weiteren Zuckerrest, insbesondere Glucoseres, der glycosidisch an die hier dargestellte Glucose in der 6-Stellung derselben gebunden ist.

25 In den Glycosiden der oben angegebenen Strukturformel I ist also der Rest einer unsubstituierten 2-Oxindol-3-essigsäure der Formel A



über seine Carboxylgruppe esterartig an die Hydroxylgruppe in der 6-Stellung eines Moleküls der Glucose gebunden.

40 Dieses Glucosemolekül ist seinerseits β-glycosidisch an die phenolische Hydroxylgruppe in der 6-Stellung des Indan-Gerüsts eines Aglycons gebunden, welches die folgende Formel II



aufweist. In dieser Verbindung der Formel II ist also in der 1-Stellung des Indan-Gerüsts ein Phenylkern gebunden, der in der p-Stellung mit einer Hydroxygruppe und in der m-Stellung mit einer Methoxygruppe substituiert ist. Des weiteren befinden sich in dieser Verbindung der Formel II die an die Stellungen 2 und 3 gebundenen Carboxylgruppen in cis-Stellung zueinander, während sich der an die 1-Stellung des Indangerüsts gebundene Phenylkern in trans-Stellung zu der Carboxylgruppe befindet, die an die 2-Stellung des Indangerüsts gebunden ist.

Sowohl das Indan-Derivat der angegebenen Formel II als auch die übrigen hier nicht dargestellten möglichen sterischen Konfigurationen bezüglich der Stellung der Wasserstoffatome und der Substituenten in den Stellungen 1, 2 und 3 sind neue chemische Verbindungen.

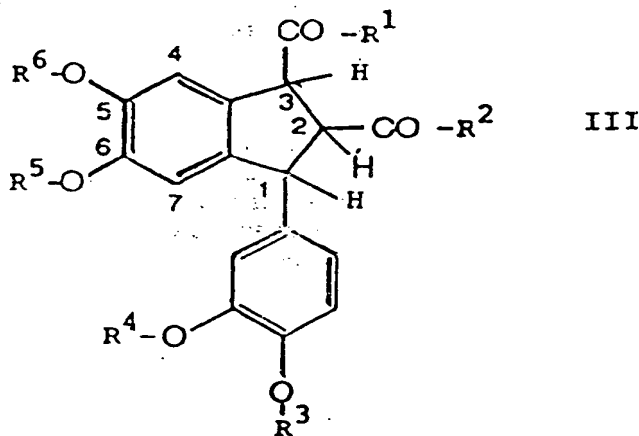
Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind also diese neuen chemischen Verbindungen der oben angegebenen Formel II und deren verschiedenen stereoisomeren Formen.

In dem Glycosid der Formel I sind die beiden Carbonsäuregruppierungen der Dicarbonsäure der Formel II esterartig an die Hydroxylgruppen in den Stellungen 3 und 6 des Fructoserestes gebunden, und zwar unter Ausbildung eines 10-gliedrigen Dilactonringes.

In denjenigen Glycosiden der Formel I, in welchen R ein Wasserstoffatom bedeutet, ist ferner an die  $\beta$ -Fructose glycosidisch ein Rest der  $\alpha$ -Glucose gebunden, sodass die an die beiden Carboxylgruppen der Verbindungen der Formel II gebundene Struktur aus zwei Hexoseeinheiten derjenigen der Saccharose entspricht.

In denjenigen Verbindungen der Formel II, in welchen R einen weiteren glycosidisch gebundenen Hexoserest darstellt, ist dieser Hexoserest vorzugsweise der Rest einer weiteren Glucoseeinheit.

Aus der Indan-Verbindung der Formel II sind synthetisch weitere Derivate der folgenden Formel III



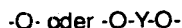
erhältlich.

In diesen Derivaten bedeuten  
R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander Gruppen der Formel



in welchen

X für Wasserstoff, substituierte oder unsubstituierte Alkylgruppen mit 1-6 Kohlenstoffatomen, beispielsweise Alkylgruppen oder substituierte oder unsubstituierte Arylgruppen oder ein oder mehrere esterartig gebundene Hexosereste stehen oder  
R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gemeinsam eine zweiwertige Gruppierung der Formel



bedeutet, wobei in diesen Formeln

Y für einen zweiwertigen organischen Rest, insbesondere einen aliphatischen, cycloaliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest steht und  
R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoffatome, gegebenenfalls substituierte Alkylreste, gegebenenfalls substituierte Cycloalkylreste, gegebenenfalls substituierte Arylreste oder Acylreste von aliphatischen, cyclo-

phatischen oder aromatischen Carbonsäuren oder ein oder mehrere Hexosereste stehen.

Wie bereits erwähnt, wurden die neuen Glycoside der Formel I aus wässrigen Extrakten von Pflanzenpollen verschiedener Arten isoliert.

Das Ausgangsmaterial, aus welchem diejenige Fraktion isoliert wird, welche diese Glycoside enthält, ist ein mit einem wässrigen Extraktionsmittel aus Pflanzenpollen gewonnener Extrakt, der höchstens 5 Gew.-% an hochmolekularen Proteinen enthält oder frei von diesen ist. Die Herstellung dieser von hochmolekularen Proteinen befreiten Pflanzenpollenextrakte erfolgt nach demjenigen Verfahren, das im Anspruch 5 des europäischen Patentes 220 453, Dokument B, erläutert wird.

Während in dem oben genannten europäischen Patent Fällungsverfahren, bzw. säulenchromatographische Trennungen durchgeführt wurden, um aus dem genannten Pollenextrakt eine an Aminosäuren, Proteinen und/oder proteinartigen Substanzen angereicherte Fraktion zu isolieren, insbesondere eine Fraktion, deren Molekulargewicht vorzugsweise im Bereich von 650-750 liegt, werden jetzt andere Isolationsverfahren durchgeführt, um solche Fraktionen zu isolieren, die frei von Aminosäuren, Proteinen und/oder proteinartigen Substanzen sind, und die Glycoside der Formel I enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Fraktionen, die Glycoside enthalten, aus dem mit wässrigen Extraktionsmitteln gewonnenen Pollenextrakt und dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man den Pollenextrakt, der als weitere Bestandteile auch noch Maltodextrine enthalten kann, in Wasser löst und einer Dialyse mit einer Membran unterwirft, die Substanzen eines Molekulargewichtes von über 1000 Dalton zurückhält, wobei das durch die Membran hindurch diffundierende Material verworfen wird und

in einem zweiten Dialyseschritt dasjenige Material, das nicht durch die Membran hindurchdiffundiert, einer Dialyse unter Verwendung einer Membran unterworfen wird, die Materialien mit einem Molekulargewicht über 3500 Dalton zurückhält, vorzugsweise einer Membran, die Materialien mit einem Molekulargewicht über 2000 Dalton zurückhält, und dann das durch diese Membran hindurchtretende Dialysat unter Vakuum eindampft und daraus durch Gelfiltration Fraktionen isoliert, welche die Glycoside der Formel I enthalten.

Gemäss einer Ausführungsart dieses Isolierungsverfahrens wird der als gelblich-weisses Pulver gewonnene Pollenextrakt zunächst in etwa der 3-4-fachen Menge an destilliertem Wasser gelöst und diese Lösung unter Verwendung von Membranen, die Substanzen mit einem Molekulargewicht über 1000 Dalton zurückhalten, gegen Wasser in der Kälte dialysiert. Beispielsweise lässt sich diese Dialyse unter Verwendung von Schläuchen aus der molekularporösen Membran durchführen, und es ist vorteilhaft, nach etwa 24 Stunden das hindurchdiffundierte Material zu verwerfen und als Aussenlösung eine frische Lösung an destilliertem Wasser einzusetzen und nochmals 24 Stunden dialysiert.

Nach diesem Dialyseschritt wird die Innenlösung, also das Material, das durch die Membran nicht hindurchgetreten ist, konzentriert, im allgemeinen auf ein Volumen, das etwa die Hälfte des Volumens der wässrigen Lösung beträgt, die dieser Dialyse unterworfen wurde. Diese konzentrierte Lösung des von der Membran zurückgehaltenen Produktes weist eine braune Farbe auf, und beim Eindampfen zur Trockene zeigt es sich, dass die Ausbeute 12 bis 25%, bezogen auf das gelblich-weiße Pulver, das als Ausgangsmaterial eingesetzt wird, beträgt.

In einem zweiten Dialyseschritt wird das nach dem Lyophilisieren erhaltene Produkt des ersten Dialyseschrittes in der 2-5-fachen Menge an Wasser gelöst, und die wässrige Lösung wird unter Verwendung einer Membran, die Produkte eines Molekulargewichtes von über 2000 Dalton nicht passieren lässt, gegen Wasser dialysiert. Die Dialyse erfolgt während einer Woche, wobei etwa das 20-fache Volumen an Wasser als Aussenlösung eingesetzt wird und diese Aussenlösung täglich gewechselt wird.

Die Aussenlösungen werden miteinander vereinigt und konzentriert und anschliessend unter Vakuum zur Trockene eingedampft. Die Ausbeute beträgt 10-30%, bezogen auf das diesem zweiten Dialyseschritt unterworfenen feste Ausgangsmaterial.

Das Material, das durch diese Membran mit einer Ausschlussgrenze von 2000 Dalton nach einer Woche nicht hindurchdiffundiert ist, also die Innenlösung, wird verworfen.

Das bei dieser zweiten Dialyse gewonnene Produkt wird als A2 bezeichnet.

Aus diesem Produkt A2 werden durch Gelfiltration drei aktive Fraktionen isoliert, die mit IIIa, IIIb und IIIc bezeichnet werden.

Die Fraktion IIIb wird durch eine weitere, ähnlich durchgeführte Gelfiltration in fünf Fraktionen aufgeteilt, von denen die Fraktion III-b5 diejenige ist, die in den durchgeführten pharmakologischen Tests die höchste Aktivität aufweist.

Diese Fraktion III-b5 wird durch Hochdruckflüssigchromatographie weiter gereinigt, wobei zwei Hauptfraktionen isoliert werden, die mit III-b51 und III-b52, oder abgekürzt als b51 oder b52 bezeichnet werden.

Es zeigte sich, dass die Fraktion b51 und auch die Fraktion b52, ein Molekulargewicht von 1001 Dalton aufweist und dass die Massenspektren von b51 und b52 praktisch identisch sind.

Des weiteren zeigte es sich, dass sich in wässriger Lösung b51 in b52 umwandelt und vice versa, wobei nach der Umwandlung, unabhängig davon, ob man von b51 oder von b52 ausgeht, das Mengenverhältnis etwa 60 Gew.-% b51 und etwa 40 Gew.-% b52 beträgt.

Durch weitere analytische Untersuchungen mit kernmagnetischen Resonanzspektren konnte ferner gezeigt werden, dass sowohl das Glycosid b51 als auch das Glycosid b52 eine solche Verbindung der Formel I ist, in welcher der

Rest R für Wasserstoff steht.

Obwohl dieses Glycosid der Formel I eine grosse Anzahl an chiralen Zentren aufweist, nämlich beispielsweise die Kohlenstoffatome in den Stellungen 2, 10 und 9 des Indan-Gerüsts, so wird dennoch der Unterschied zwischen dem Glycosid b51 und dem Glycosid b52, lediglich durch eine unterschiedliche Konfiguration am chiralen Zentrum der Indol-3-essigsäure verursacht. Entsprechende Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das Glycosid b51 von dem Glycosid b52 bezüglich der Konfiguration am chiralen Zentrum des Kohlenstoffatoms in der 3-Stellung der 2-Oxindol-3-essigsäure unterscheidet.

Wenn man das Glycosid der Formel I, in welcher R ein Wasserstoffatom ist, unter stark sauren Bedingungen hydrolysiert, dann wird durch Umlagerung aus der 2-Oxindol-3-essigsäure der Formel A die 2-Oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-4-carbonsäure gebildet und auch die Indan-dicarbonensäure der Formel II wird als Aglycon von den Zuckerresten abgespalten.

Die 2-Oxindol-3-essigsäure der Formel A, wie auch die 2-Oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-4-carbonsäure sind in Form ihres Racemates seit langem bekannt. Das Indan-Derivat der Formel II stellt jedoch, wie bereits erwähnt wurde, eine neue chemische Verbindung dar.

Das Indan-Derivat der Formel II weist ein Molekulargewicht von 360 Dalton auf. Diese Dicarbonensäure spaltet jedoch aufgrund der cis-Stellung der beiden Carboxylgruppen sehr leicht Wasser ab, sodass im Massenspektrum, je nach Aufnahmebedingungen, praktisch nur ein dem Anhydrid entsprechender Massenpeak beobachtet wurde, der ein um 18 Dalton geringeres Molekulargewicht aufweist, also ein Molekulargewicht von 342 Dalton.

Des weiteren lassen sich aus der Fraktion IIIa durch Säulenchromatographie zwei Haupt-peaks isolieren, die als A3 und A4 bezeichnet werden. Von diesen ergibt der Peak A3 bei der Hochdruckflüssigchromatographie drei Hauptfraktionen, die als A31, A32 und A34 bezeichnet werden.

Aus dem zweiten mit A4 bezeichneten Peak lassen sich durch Hochdruckflüssigchromatographie zwei Fraktionen isolieren, die als A41 und A42 bezeichnet werden. Jede dieser beiden Fraktionen weist ein Molekulargewicht von 1163 Dalton auf, und es zeigte sich, dass in einer wässrigen Lösung wiederum ein Gleichgewicht zwischen A41 und A42 besteht.

Bei der sauren Hydrolyse ergibt das Paar A41/A42 unter anderem ein Aglycon, das mit demjenigen Aglycon identisch sind, das durch die saure Hydrolyse aus dem Paar b51/b52 erhalten wird.

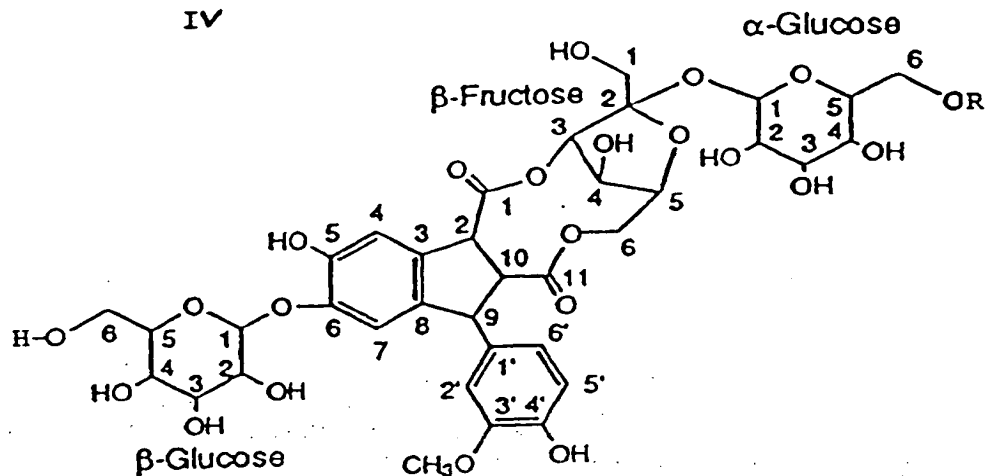
Durch weitere Untersuchungen wurde bewiesen, dass das Paar A41/A42 dasjenige Glycosid der Formel I ist, in welchem R für einen weiteren, an den Glucoseresst des Saccharoseteils glycosidisch gebundenen Glucoseresst steht.

Wenn man nämlich das Paar A41/A42 mit einer  $\alpha$ -Glucosidase behandelt, dann wird aus der Verbindung der Formel I der Glucoseresst R abgespalten, und man erhält das Paar b51/b52, also diejenige Verbindung der Formel I, in welcher R ein Wasserstoffatom ist.

In gleicher Weise, wie dies weiter vorne für das Glycosid b51 und das Glycosid b52 erläutert wurde, unterscheidet sich das Glycosid A41 von dem Glycosid A42 lediglich bezüglich der Konfiguration an demjenigen chiralen Zentrum, welches durch das Kohlenstoffatom in der 3-Stellung des heterocyclischen Ringes des Restes der 2-Oxindol-3-essigsäure gebildet wird.

Während, wie bereits erwähnt wurde, die Verbindung der Formel I, in welcher R ein Wasserstoffatom ist und auch die Verbindung der Formel I, in welcher R für den  $\alpha$ -glycosidisch gebundenen Glucoseresst steht, bei der sauren Hydrolyse, beispielsweise unter Verwendung 1-normaler Salzsäure bei 100° das Aglycon der Formel II und auch das Aglycon, welches die aus der 2-Oxindol-3-essigsäure der Formel A gebildete 2-Oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-4-carbonsäure ist, liefert, so gelingt es unter milden basischen Bedingungen lediglich den an den Glucoseresst gebundenen Rest der 2-Oxindol-essigsäure abzuspalten, und man erhält so eine neue Glycosid, welches der folgenden Formel IV

IV



entspricht, wobei in dieser Formel R entweder für ein Wasserstoffatom oder für einen Hexoseresst steht, der identisch mit dem Hexoseresst des Ausgangsmaterials ist. Dementsprechend ist ein Rest R in der Bedeutung eines Hexoseresstes vorzugsweise ein  $\alpha$ -glucosidisch gebundener Glucoseresst.

Aus diesem Glycosid können durch weitere Behandlungen noch Glucoseresste abgespalten werden, beispielsweise ein Rest R in der Bedeutung eines  $\alpha$ -glucosidisch gebundenen Glucoseresstes durch Behandlung mit  $\alpha$ -Glucosidase abgespalten werden, sodass man entsprechende Produkte der oben angegebenen Formel erhält, in welchen R für Wasserstoff steht.

Des weiteren ist es auch möglich, in beliebiger Reihenfolge den an die phenolische OH-Gruppe gebundenen Glucoseresst abzuspalten und ferner den esterartig an die beiden Dicarbonsäurereste gebundenen Rest der  $\beta$ -Fructose abzuspalten, sodass man schliesslich aus dem Glycosid der oben angegebenen Formel durch stufenweise Abspaltung von Zuckerresten, bzw. Saccharose, das Aglycon der weiter vorne angegebenen Formel II erhält.

Die neuen Glycoside der Formel I und der oben angegebenen Formel IV, sowie das Aglycon der Formel II und die aus diesem hergestellten Derivate der Formel III weisen interessante pharmakologische Wirksamkeiten auf. So sind diese neuen Verbindungen beispielsweise in der Lage, eine Modulation des Immunsystems warmblütiger Tiere hervorzurufen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Präparate zur Modulation des Immunsystems bei warmblütigen Tieren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie als Wirkstoff ein Glycosid der weiter vorne angegebenen Formeln I oder IV oder ein Aglycon der weiter vorne angegebenen Formel II oder ein Derivat des Aglycons der weiter vorne angegebenen Formel III enthalten.

Weitere Tests zeigten, dass die Wirksamkeit der erfindungsgemässen neuen Glycoside, Aglycone und deren Derivate gehemmt wird, wenn zusätzlich solche Faktoren anwesend sind, die zu einer Hemmung der Stimulierung der Makrophagen oder zu einer Hemmung der Stimulierung der T-Zellen führen.

Die neuen Glycoside der Formeln I und IV, sowie das Aglycon der Formel II und deren Derivate der Formel IV, können als Wirkstoffe in solchen pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden, durch welche Tumore, verschiedene Viruskrankheiten, insbesondere solche, die durch Retroviren hervorgerufen werden, wie zum Beispiel Aids, und andere krankhafte Zustände behandelt werden können, die mit einer Schwächung des Immunsystems, bzw. mit einer reduzierten Immunreaktion verbunden sind.

Durch entsprechende Tests konnte gezeigt werden, dass die Lebensdauer von Mäusen, denen verschiedene Krebszellen eingepflanzt worden waren, durch die Verabreichung der Glycoside der Formeln I und IV und durch die Verabreichung des Aglycons und dessen Derivate wesentlich verlängert werden, und zwar im Vergleich zu einer Vergleichsgruppe, an die keine derartigen neuen Verbindungen verabreicht worden war. Besonders gute Effekte konnten mit eingepflanzt Lungenkarzinom (Lewis Lung), Sarkom (S180) und Brustkarzinom (E0771) nachgewiesen werden und auch eine gewisse Aktivität bei Fibrosarkom (T241) und Dickdarmkarzinom (C38) festgestellt werden. Durch die Verabreichung dieser Verbindungen konnten sogar Krebstumoren bei Mäusen, die nach der Einpflanzung entsprechender Krebszellen entstanden waren, vollständig ausgeheilt werden.

In den nachfolgenden Beispielen werden spezielle Ausführungsarten des Verfahrens zur Isolierung der neuen Glycoside der Formel I aus dem wässrigen Extrakt von Pollen beschrieben.

Des weiteren werden auch Verfahren zur Herstellung von zuckerfreien Abbauprodukten aus diesen Glycosiden

erläutert.

### Beispiel 1

5 Isolierung von solchen Fraktionen aus Pollenextrakten, die an Glycosiden der Formel I angereichert sind.  
Aus den Pollen von Pflanzen, beispielsweise Roggen, wurde durch Extraktion mit einem Gemisch aus Wasser und einem vollständig wasserlöslichen organischen Lösungsmittel, beispielsweise Aceton, ein wässriger Pollenextrakt hergestellt. Zu diesem Zwecke rührte man die Pollen bei einer Temperatur von 30-32° C während 48 Stunden. Dabei werden durch eine Autofermentation die hochmolekularen Proteine und Zucker des Pollens abgebaut. Es wurde dann noch  
10 während weiterer 20 bis 30 Stunden bei 30° gerührt.

Das wässrige Medium wurde von den Pollen abfiltriert, und die so erhaltene klare Lösung unter Vakuum zur Trockene eingedampft. Man erhielt dabei den getrockneten Pflanzenpollenextrakt in Form eines gelblich-weißen Pulvers.

### Durchführung des ersten Dialyseschlittes

15 80 g des so erhaltenen gelblich-weißen Pulvers wurde in 280 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde in einen Schlauch aus einer molekular porösen Membran gefüllt, die Substanzen eines Molekulargewichts von weniger als 1000 Dalton hindurchtreten liess.

Die Länge des Schlauches betrug etwa 45 cm, und er wurde zu etwa einem Drittel seines Gesamtvolumens mit dieser Lösung gefüllt. Sechs derartige Schläuche wurden hergestellt und in 10 l kaltes Wasser eingebracht und die Dialyse in der Kälte (etwa 4° C) während 24 Stunden durchgeführt. Nach dieser Zeit wurde die Aussenlösung entfernt und verworfen und gegen 10 l kaltes Wasser ausgetauscht. Nach einer weiteren Dialysezeit von 48 Stunden wurde das in den Schläuchen verbliebene Material entnommen und der Inhalt jedes der sechs Schläuche unter Vakuum zur Trockene eingedampft.

25 Man erhielt dabei 20 g eines Trockenrückstandes, entsprechend einer Ausbeute von 25% der theoretischen Ausbeute, bezogen auf das eingesetzte Ausgangsmaterial.

### Durchführung des zweiten Dialyseschlittes

30 Dieser zweite Dialyseschlitt wurde unter Verwendung einer Membran durchgeführt, die Substanzen eines Molekulargewichts von 2000 Dalton zurückhielt.

20 g des aus dem ersten Dialyseschlitt erhaltenen Trockenproduktes wurden in 100 ml Wasser gelöst, und die Lösung in vier Dialyseschläuche gefüllt, von denen jeder etwa zu einem Drittel seines Volumens gefüllt war.

35 Diese vier Schläuche wurden gegen 2 l Wasser während eines Tages dialysiert, und dann wurde die Aussenlösung gewonnen und die Dialyse gegen 2 l frisches Wasser weitergeführt. Insgesamt wurde unter täglichem Wechsel der Aussenlösung die Dialyse während einer Woche durchgeführt.

Anschliessend wurden die Aussenlösungen miteinander vereinigt und unter Vakuum zunächst auf 100 ml konzentriert und dann zur Trockene eingedampft.

Nach dieser einwöchigen Dialyse wurde der verbliebene Schlauchinhalt, also die Innenlösung, verworfen.

40 Man erhielt bei diesem zweiten Dialyseschlitt 5-6 g eines leicht gelblich gefärbten Pulvers, und die Ausbeute betrug dementsprechend 25-30% der theoretischen Ausbeute, bezogen auf das Material, das diesem zweiten Dialyseschlitt unterworfen wurde.

### Isolierung von Fraktionen aus dem Produkt des zweiten Dialyseschlittes

45 Das Produkt des zweiten Dialyseschlittes wurde der Gelfiltration unter Verwendung von Sephadex G-25 SF unterworfen. Hierzu verwendete man eine Säule eines Durchmessers von 3,6 cm und einer Länge von 90 cm. Als Laufmittel wurde deionisiertes Wasser verwendet, und der Durchfluss des Laufmittels betrug 20 ml/Std. Es wurden Fraktionen von 10 ml aufgefangen.

50 Man erhielt dabei drei wirkstoffhaltige Fraktionen, die mit IIIa, IIIb und IIIc bezeichnet werden.

Die Fraktion IIIb wurde einer weiteren Gelfiltration unter Verwendung einer mit Sephadex G-25 SF gefüllten Säule unterworfen, und bei dieser zweiten Gelfiltration wurden 5 Fraktionen gewonnen, von denen die Fraktion III-b4 leicht gelblich war und die Fraktion b5 80% des gesamten Feststoffs enthielt, die durch Eindampfen jeder der fünf Fraktionen zur Trockene erhalten wurden.

55 Die Fraktion III-b5 wurde einer Hochdruckflüssigchromatographie unterworfen, wobei man zwei Hauptfraktionen erhielt, die mit b51 und b52 bezeichnet wurden. Diese Fraktionen wiesen im UV-Bereich eine Absorption bei 280 nm auf, und sie enthielten 40% der Feststoffe, die der Hochdruckflüssigchromatographie unterworfen worden waren.

Beispiel 2

Es wurde nach dem Verfahren gemäss Beispiel 1 gearbeitet, wobei wiederum die erste Dialyse unter Verwendung einer Membran durchgeführt wurde, die Substanzen eines Molekulargewichts von mindestens 1000 Dalton zurückhielt. In diesem Fall wurden 115 g des gelblich-weissen Pulvers in 500 ml Wasser gelöst, und die Dialyse wurde gegen ein Volumen von 10 l Wasser durchgeführt. Die Dialyse wurde während 48 Stunden in der Kälte durchgeführt, wobei die Aussenlösung viermal gewechselt und verworfen wurde.

Die vereinigten Innenlösungen wurden lyophilisiert und man erhielt dabei 16 g Trockenprodukt. Dementsprechend betrug die Ausbeute, bezogen auf den der Dialyse unterworfenen Feststoff 14 Gew.-%.

Der zweite Dialyseschritt wurde in diesem Fall unter Verwendung einer Spektrapormembran durchgeführt, die Materialien eines Molekulargewichts von 3500 Dalton und mehr zurückhielt.

16 g des Produktes des ersten Dialyseschrittes wurden in 40 ml Wasser gelöst und gegen 1 l Wasser während 24 Stunden dialysiert. Dann wurde die Aussenlösung entfernt und aufbewahrt, und es wurde während weiterer 24 Stunden gegen 1 l frisches Wasser dialysiert.

Insgesamt wurde diese Dialyse unter täglichem Wechsel der Aussenlösung während neun Tagen durchgeführt, und nach dem neunten Tag wurde der Inhalt der Schläuche verworfen. Der Feststoffgehalt der zur Trockene eingedampften Aussenlösungen war wie folgt:

Aussenlösung, gewonnen nach dem Tag	Trockengewicht des Eindampfungsrückstandes in mg
1	600
2	500
3	250
4 + 5	400
6 + 7	200
8 + 9	200

Insgesamt wurden also nach dieser neuntägigen Dialyse 2'150 mg gewonnen, und diese Trockenrückstände der Aussenlösungen wurden miteinander vereinigt und der weiteren Gelfiltration unterworfen.

2 g des Produktes des zweiten Dialyseschrittes wurden auf eine mit Sephadex G-25 SF gefüllte Säule eines Durchmessers von 2,6 cm und einer Länge von 90 cm aufgetragen.

Bei dieser Gelfiltration wurden die in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen aufrechterhalten, und es wurden wieder drei Fraktionen gewonnen, die nach dem Eindampfen zur Trockene die folgenden Feststoffgehalte aufwiesen:

IIIa : 45 mg  
IIIb : 39 mg  
IIIc : 22 mg.

Die Fraktion III-b wurde unter Verwendung einer mit Sephadex G-25 SF gefüllten Säule in fünf Wirkstoff-Fractionen aufgeteilt, die mit III-b1, b2, b3, b4 und b5 bezeichnet werden. Es zeigte sich, dass die Fraktion b5 80% der Feststoffe sämtlicher Fraktionen b1 bis b5 enthält.

Diese Fraktion III-b5 wurde durch Hochdruckflüssigchromatographie weiter gereinigt, wobei zwei Fraktionen gewonnen wurden, die im UV-Bereich eine Lichtabsorption bei 280 nm aufwiesen. Diese beiden Fraktionen werden mit b51 und b52 bezeichnet.

Beispiel 3

Durch Strukturaufklärung mit der Infrarotspektrometrie und kernmagnetischen Resonanz konnte gezeigt werden, dass die gemäss Beispiel 1 und gemäss Beispiel 2 gewonnenen Fraktionen mit der Bezeichnung b51 und b52 dasjenige Glycosid der weiter vorne angegebenen Formel I enthielten, in welcher R Wasserstoff ist und das ein Molekulargewicht von 1001 Dalton aufweist.

Es konnte gezeigt werden, dass sich aus der reinen Fraktion b51 in Wasser allmählich eine Mischung aus b51 und b52 bildet, und dass andererseits die reine Fraktion b52 in Wasser ebenfalls eine Mischung aus b51 und b52 mit glei-

chem Mischungsverhältnis bildet. Das Gleichgewicht in der wässrigen Lösung liegt bei etwa 40 Gew.-% b52 und 60 Gew.-% b51. Aus der Gleichgewichtsmischung lässt sich wieder durch Säulenchromatographie eine Fraktion b51 und eine Fraktion b52 isolieren.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Produkt b51 und das Produkt b52 stereoisomere Formen bezüglich des Kohlenstoffatoms in der 3-Stellung des heterocyclischen Kernes des Molekülteils der 2-Oxindol-3-essigsäure darstellen.

#### Beispiel 4

Gemäss Beispiel 1 und Beispiel 2 wurden durch die Gelfiltration auf der mit Sephadex G-25 gefüllten Säule drei Fraktionen mit der Bezeichnung IIIa, IIIb und IIIc isoliert.

In diesem Beispiel wird jetzt die Fraktion IIIa einer weiteren Trennung unter Verwendung einer mit Sephadex G-25 gefüllten Säule unterworfen. Auf diese Säule wurden 140 mg der Fraktion IIIa aufgetragen und bei dieser Gelfiltration erhielt man eine Fraktion mit der Bezeichnung A3, die nach dem Eindampfen 30 mg Feststoff lieferte und eine Fraktion mit der Bezeichnung A4, die nach dem Eindampfen zur Trockene 66 mg lieferte.

Die Gesamtmenge, die in den Fraktionen A3 und A4 enthalten war, entsprach also einer Ausbeute von 65% des aufgetragenen Feststoffes.

Die Fraktion A3 wurde einer Hochdruckflüssigchromatographie unterworfen und dabei wurden zwei Hauptfraktionen mit der Bezeichnung A41 und A42 gewonnen.

Die Wirkstoffe dieser beiden Fraktionen besaßen ein Molekulargewicht von 1163 Dalton, und das Massenspektrum der Fraktion A41 war identisch mit demjenigen der Fraktion A42.

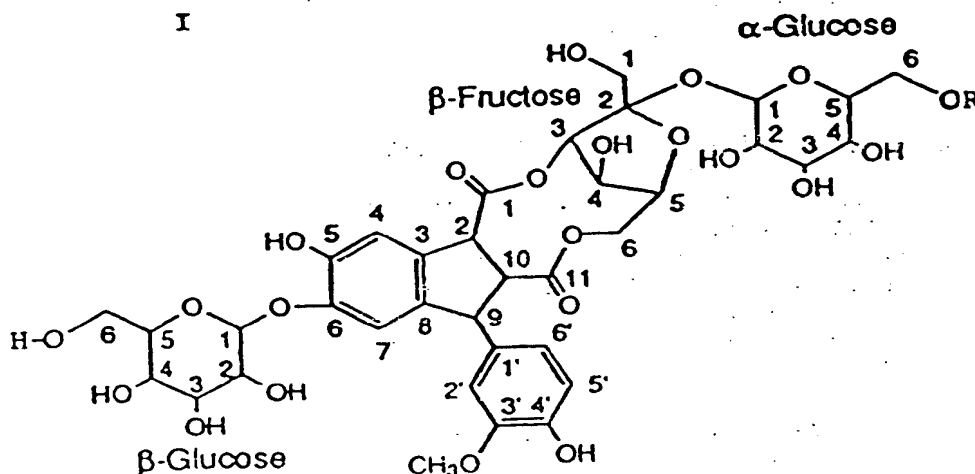
Das Massenspektrum dieser Fraktionen A41 und A42 war also um 162 Dalton höher als dasjenige der gemäss Beispiel 3 isolierten Fraktionen b51 und b52, woraus geschlossen werden kann, dass sich das gemäss Beispiel 3 isolierte Wirkstoffpaar b51/b52 von dem jetzt isolierten Wirkstoffpaar A41/A42 durch eine glycosidisch gebundene Hexoseinheit unterscheidet.

Durch weitere analytische Untersuchungen konnte ferner bewiesen werden, dass das durch saure Hydrolyse gebildete Aglycon des Paares A41/A42 identisch mit dem Aglycon des Paares b51/b52 ist, und durch kernmagnetische Resonanzspektren konnte ferner bewiesen werden, dass das Glycosidenpaar A41/A42 der Formel I entspricht, wobei R der Rest einer Glucoseeinheit ist.

Auch beim Glycosidenpaar A41/A42 wandeln sich in wässriger Lösung die Glycoside dieses Paares ineinander um, wobei sich auch hier, unabhängig davon, ob man vom Glycosid A41 oder vom Glycosid A42 ausgeht, einige Zeit ein identisches Gleichgewichtsgemisch 1 einstellt. Auch in diesem Fall besteht der Unterschied zwischen dem Glycosid A41 und dem Glycosid A42 in der sterischen Konfiguration am chiralen Zentrum in der 3-Stellung des Indolkerns der 2-Oxindol-3-essigsäure.

#### Beispiel 5

Das gemäss Beispiel 2 isolierte Glycosidenpaar b51/b52 wurde unter milden alkalischen Bedingungen behandelt. Dabei konnte ein Glycosid der folgenden Struktur



isoliert werden, wobei in diesem Glycosid R ein Wasserstoffatom und Z ebenfalls ein Wasserstoff war.

#### Beispiel 6

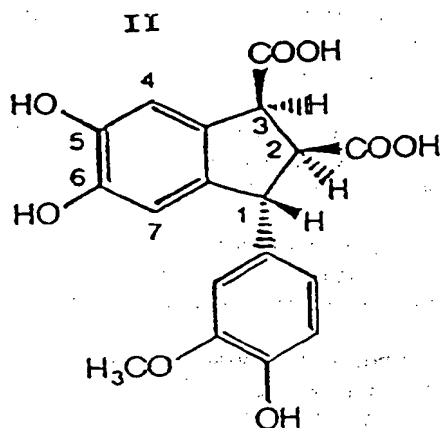
In diesem Beispiel wurde das gemäss Beispiel 4 erhaltene Glycosidenpaar A41/A42 der Behandlung mit der  $\beta$ -Glucosidase unter alkalischen Bedingungen unterworfen.

In diesem Fall erhielt man ein Glycosid, welches der im Beispiel 5 angegebenen Struktur entspricht, wobei jedoch jetzt der Rest R ein glycosidisch gebundener Glucoserest war.

#### Beispiel 7

3 bis 5 mg des gemäss Beispiel 3 isolierten Glycosidenpaares b51/b52 wurden in 250-330  $\mu$ l einer 1,0 normalen Salzsäure gelöst. Man behandelte die Lösung sechs Stunden lang unter Vakuum bei 100° C.

Anschliessend wurde getrocknet, mit Wasser gewaschen und zentrifugiert, wobei ein dunkelbrauner Niederschlag erhalten wurde. Dieser Niederschlag wurde verworfen, und die darüberstehende Flüssigkeit durch Hochdruckflüssigchromatographie gereinigt. Durch dieses Reinigungsverfahren wurde das Aglycon der durch die folgende Formel II



veranschaulichten relativen Konfiguration isoliert.

Die Struktur dieser Indan-dicarbonsäure wurde durch Massenspektren und kernmagnetische Resonanzspektren bewiesen.

In gleicher Weise wurde auch das gemäss Beispiel 4 hergestellte Glycosidenpaar A41/A42 der sauren Hydrolyse mit der 1-normalen Salzsäure unterworfen.

Auch in diesem Falle wurde das wasserlösliche Material der Hochdruckflüssigchromatographie unterworfen und man konnte wieder als Aglycon die Verbindung der oben angegebenen Formel II isolieren.

#### Beispiel 8

##### Testung der pharmakologischen Wirksamkeit der Glycoside der Formel I

Zur Durchführung des pharmakologischen Testes wurden weibliche Mäuse verwendet, die 5-7 Wochen alt waren und ein Gewicht von 19-22 g aufwiesen.

Am Tage 0 wurden an jedes Tier  $1,5 \times 10^5$  Tumor S180 Zellen durch intraperitoneale Injektion verabreicht.

Am Tage 1 wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in einzelne Gruppen sortiert, wobei jede Gruppe 6 Mäuse umfasste und in jeder Gruppe die Tiere ein ähnliches Gewicht aufwiesen.

Nach einer Zeit von einer Woche hatten sich bei sämtlichen Tieren sämtlicher Gruppen deutlich sichtbare Tumore ausgebildet.

In der Gruppe zu Vergleichszwecken (Gruppe 1) wurden die Tiere keiner weiteren Behandlung unterworfen. An die Tiere der Gruppen 2-6 wurde anschliessend durch intraperitoneale Injektion das Glycosid der Formel I verabreicht, in welchem R ein Wasserstoffatom war. Dieses Glycosid wurde am Tage 1 in einer Dosierung von 50  $\mu$ g pro Maus (Gruppe 2), bzw. 75  $\mu$ g pro Maus (Gruppe 3), bzw. 100  $\mu$ g pro Maus (Gruppe 4), bzw. 150  $\mu$ g pro Maus (Gruppe 5), bzw. 200  $\mu$ g pro Maus (Gruppe 6) verabreicht. Die Injektionen wurden in der selben Dosis an den Tagen 3, 5, 7 und 9

wiederholt.

Dabei zeigte es sich, dass auch bei der höchsten angewandten Dosierung in der Gruppe 6 keine toxische Wirkung auf die Tiere nachgewiesen werden konnte.

Zehn bis zwölf Tage nach Beginn des Versuches waren sämtliche Tiere der Vergleichsgruppe (Gruppe 1) infolge des Tumors verstorben. Bei den mit dem Glycosid behandelten Mäusen wurde jedoch eine Heilung bei 50% der Tiere erreicht. Diese Tiere lebten bei Abbruch des Versuches bereits mehr als 50 Tage bei guter Gesundheit. Bei den restlichen Tieren der Gruppen 2-6 wurde eine deutliche Rückbildung der Tumore beobachtet.

Die Versuchsergebnisse waren bei verschiedenen anderen menschlichen Tumorzellen ähnlich, wie dies oben für die Tumor S-180-Zellen beschrieben ist. Auch in diesem Fall konnte mit dem Glycosid der Formel I rasch ein Ausheilen der Tumore erreicht werden.

Des weiteren wurde das Glycosid auch in Zellkulturen auf seine Tumoraktivität untersucht. Dabei zeigte es sich, dass dieses Glycosid keine cytotoxischen Eigenschaften auf die Tumorzellen ausübte.

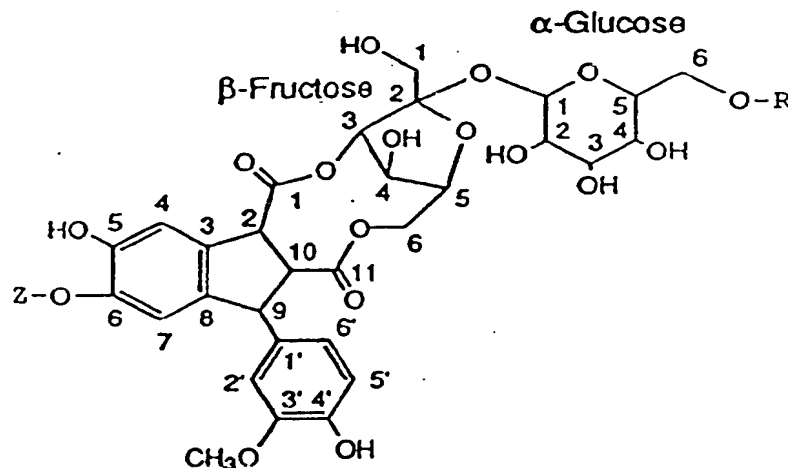
Diese völlig überraschende Ausheilung der Tumore durch die Verabreichung der aus den Pollenextrakten isolierten Naturstoffe ist deshalb auf eine Modulierung der Immunreaktion der lebenden Tiere und nicht auf cytotoxische Eigenschaften der aus dem Naturstoff isolierten Glycoside zurückzuführen.

### Beispiel 9

Analoge Tests, wie im Beispiel 8 beschrieben, wurden mit dem Glycosid der Formel I durchgeführt, in welchem R ein weiterer glycosidisch gebundener Glucoseresst ist. In diesem Falle waren die Testergebnisse denjenigen des Beispiels 8 sehr ähnlich. Auch hier ist selbst bei der niedrigsten Dosierung von nur 50 µm pro Maus/Injektion in der ersten Testgruppe bei 30% der Tiere eine vollkommene Heilung festgestellt worden.

### Patentansprüche

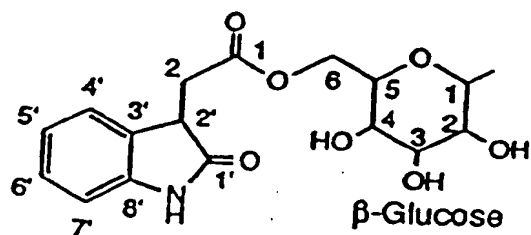
1. Pharmakologisch wirksame Glycoside, dadurch gekennzeichnet, dass sie die folgende Formel



aufweisen, wobei in dieser Formel

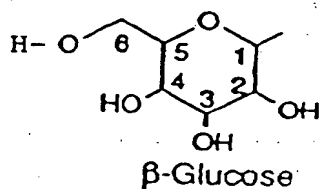
R ein Wasserstoffatom oder ein glycosidisch gebundener Hexoseresst oder eine Gruppe aus 2 oder mehr Hexoseressten ist und

Z ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe der Formel A



A

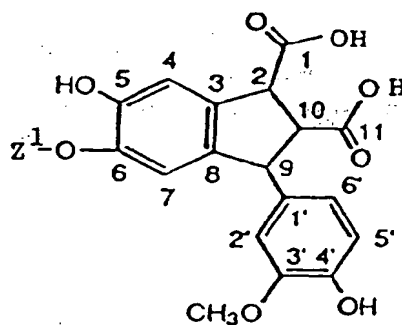
oder der Formel B



B

bedeutet,

oder dass diese Glycoside die folgende Formel

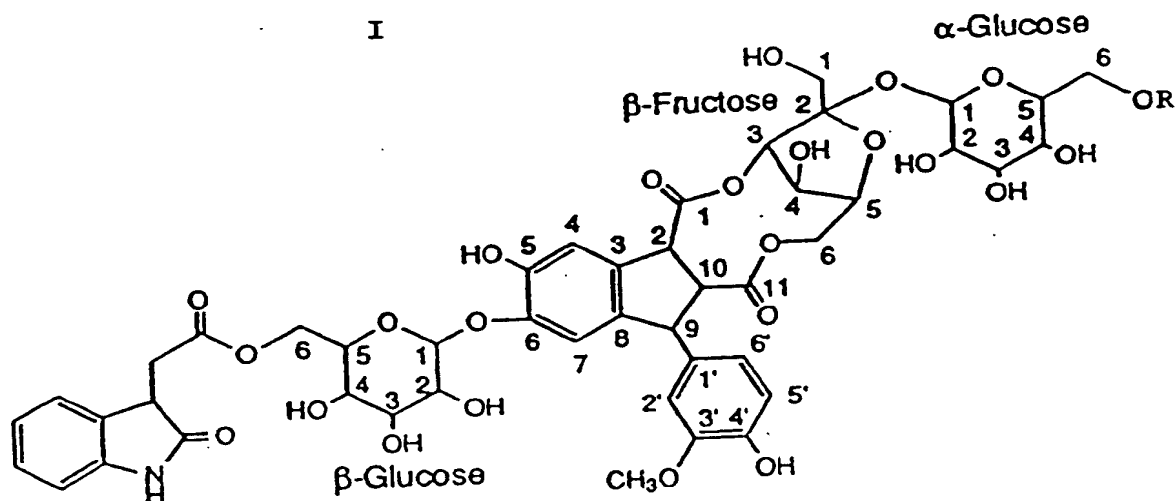


aufweisen, wobei in diesen Glycosiden

Z<sup>1</sup> ein glycosidischer Rest der oben angegebenen Formel A oder der oben angegebenen Formel B ist.

2. Glycosid gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Formel I

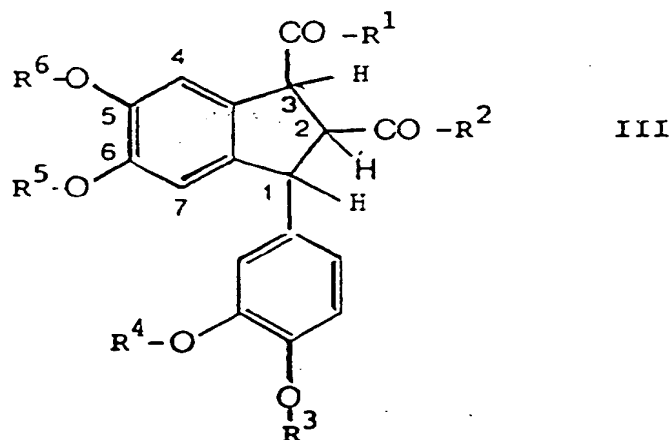
I



aufweist, wobei in dieser Formel

R ein Wasserstoffatom oder ein Hexoserest, vorzugsweise ein Glucoserest ist.

3. Indanderivate mit pharmakologischer Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass sie die folgende Formel III



aufweisen, wobei in dieser Formel

$R^1$  und  $R^2$  unabhängig voneinander Gruppen der Formel



in welchen

X für Wasserstoff, substituierte oder unsubstituierte Alkylgruppen mit 1-6 Kohlenstoffatomen, beispielsweise Arylgruppen oder substituierte oder unsubstituierte Arylgruppen oder ein oder mehrere esterartig gebundene Hexosereste stehen oder

$R^1$  und  $R^2$  gemeinsam eine zweiwertige Gruppierung der Formel



bedeutet, wobei in diesen Formeln

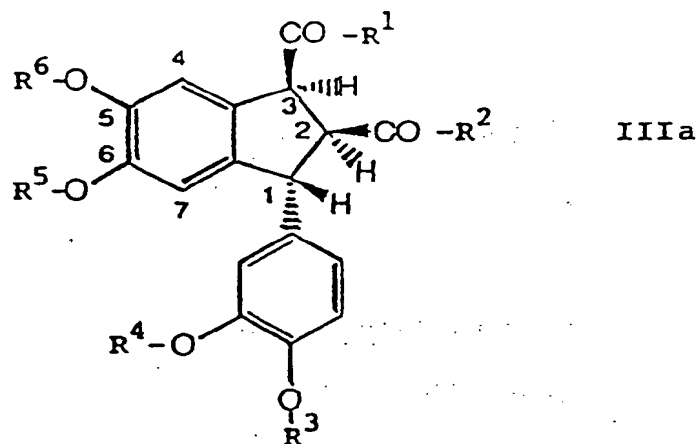
Y für einen zweiwertigen organischen Rest, insbesondere einen aliphatischen, cycloaliphatischen oder aro-

matischen Kohlenwasserstoffrest steht und

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  und  $R^6$  unabhängig voneinander für Wasserstoffatome, gegebenenfalls substituierte Alkylreste, gegebenenfalls substituierte Cycloalkylreste, gegebenenfalls substituierte Arylreste oder Acylreste von aliphatischen, cyclo-aliphatischen oder aromatischen Carbonsäuren oder ein oder mehrere Hexosereste stehen.

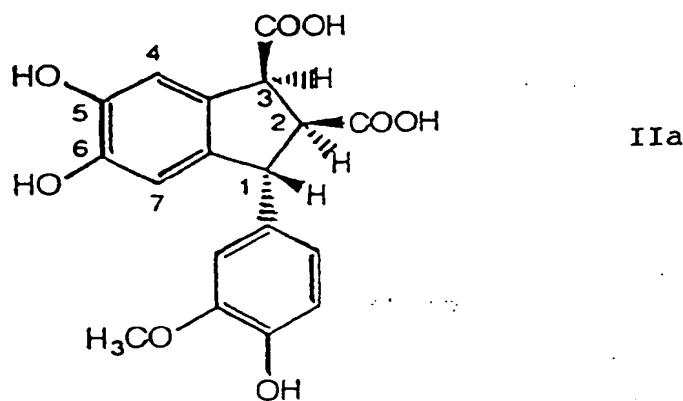
4. Indanderivate gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass in ihnen  $R^1$  und  $R^2$  für eine Hydroxygruppe steht,  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^5$  ein Wasserstoffatom ist und  $R^6$  für einen Methylrest steht.

5. Indanderivate gemäss Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie die durch die folgende Formel IIIa



veranschaulichte relative Konfiguration aufweisen, wobei in dieser Formel IIIa  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  und  $R^6$  die gleiche Bedeutung aufweisen, wie in Formel III.

6. Indanderivate gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie die durch die folgende Formel IIa



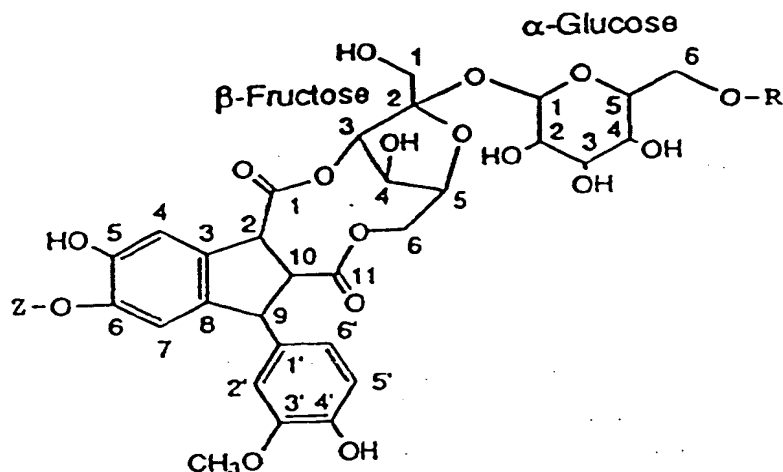
veranschaulichte relative Konfiguration aufweisen.

7. Pharmazeutisches Präparat zur Modulation des Immunsystems warmblütiger Tiere, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff ein Glycosid der in Anspruch 1 angeführten Strukturformel oder ein Indanderivat der Formel III gemäss Anspruch 3 enthält.

8. Pharmazeutisches Präparat gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff ein Glycosid

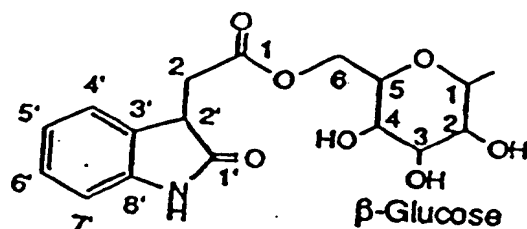
gemäss Anspruch 2 oder ein Indanderivat gemäss einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält.

9. Pharmazeutisches Präparat gemäss Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Präparat zur in vivo Bekämpfung von Tumoren oder zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, insbesondere durch Retroviren verursachter Krankheiten, beispielsweise Aids, ist und dass es die Wirkstoffe der angegebenen Formeln oder pharmazeutisch annehmbare Salze dieser Wirkstoffe enthält.
10. Verfahren zur Gewinnung der Glycoside gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem wässrigen Extrakt von Pflanzenpollen diejenigen Glycoside der folgenden Formel gewinnt,



in welchen

R ein Wasserstoffatom oder ein glycosidisch gebundener Hexoserest ist und Z für den über die  $\beta$ -Glucose-Einheit gebundenen glycosidischen Rest der Formel A

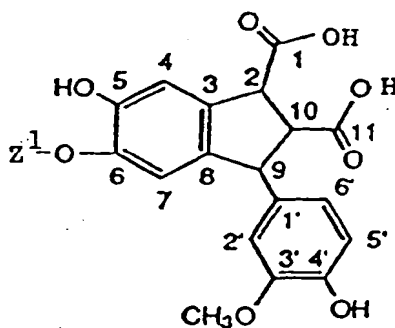


A

steht, indem man aus dem wässrigen Extrakt der Pflanzenpollen durch Dialyse unter Verwendung einer Membran, die Substanzen eines Molekulargewichts von über 1000 Dalton zurückhält, diejenigen Bestandteile entfernt, die diese Membran passieren, und dann einen zweiten Dialyseschnitt unter Verwendung einer Membran durchführt, die Materialien eines Molekulargewichts von über 3500 Dalton, vorzugsweise über 2000 Dalton, zurückhält, wobei die Glycoside aus dem die Membran passierenden Dialysat durch eine Hochdruckflüssigchromatographie isoliert werden,

und dann gegebenenfalls die so erhaltenen Produkte unter leicht basischen Bedingungen behandelt, wobei man diejenigen Glycoside der oben angegebenen Formel erhält, in welcher Z die  $\beta$ -Glucoseeinheit der Formel B ist, oder

dass man das Glicosid der angegebenen Formel, in welchem Z für die Gruppe der oben angegebenen Formel A steht, einer Esterabspaltung unterwirft, wobei man dasjenige Glycosid der Formel



isoliert, in welchem Z<sup>1</sup> für eine glycosidische Gruppe der Formel A oder den Glucoseresst der Formel B steht.

11. Verfahren zur Herstellung des Aglycons der Formel III gemäss Anspruch 3, in welchem

R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> für Hydroxygruppen stehen,  
R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> Wasserstoff bedeuten und  
R<sup>4</sup> eine Methylgruppe ist,

dadurch gekennzeichnet, dass man die nach dem Verfahren gemäss Anspruch 10 hergestellten Glycoside einer sauren hydrolytischen Spaltung unterwirft und das Aglycon der Formel III isoliert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem Produkt der hydrolytischen Spaltung ein Aglycon der Formel IIa gemäss Anspruch 6 isoliert.

13. Verfahren gemäss Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem Aglycon der Formel III, bzw. IIa, diejenige Verbindung der Formel III gemäss Anspruch 3, bzw. der Formel IIa gemäss Anspruch 5 durch Verätherungsreaktionen, Veresterungsreaktionen oder Aetherspaltung synthetisch herstellt, in welchen mindestens einer der Substituenten R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> eine andere Bedeutung aufweist als diejenige von Hydroxygruppen, oder mindestens einer der Reste R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> oder R<sup>6</sup> eine andere Bedeutung aufweist als diejenige eines Wasserstoffatoms oder der Rest R<sup>4</sup> eine andere Bedeutung aufweist als diejenige eines Methylrestes.



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 757 055 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:  
22.04.1998 Patentblatt 1998/17

(43) Veröffentlichungstag A2:  
05.02.1997 Patentblatt 1997/06

(21) Anmeldenummer: 96110132.6

(22) Anmeldetag: 23.06.1996

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C07H 17/08**, A61K 31/70,  
C07C 62/32, C07C 62/34,  
C07C 69/757, A61K 31/19

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

(30) Priorität: 30.06.1995 CH 1930/95

(71) Anmelder: Cerbios-Pharma S.A.  
CH-6917 Barbengo (CH)

(72) Erfinder:  
• Jaton, Jean-Claude  
1226 Thonex (CH)  
• Marazza, Fabrizio  
6986 Novaggio (CH)

• Lewenstein, Ari  
8002 Zürich (CH)  
• Sirotnak, Francis M.  
New York 10028 (US)  
• Jaun, Bernhard  
8117 Fällanden (CH)

(74) Vertreter:  
Blum, Rudolf Emil Ernst et al  
c/o E. Blum & Co  
Patentanwälte  
Vorderberg 11  
8044 Zürich (CH)

### (54) Neue Glykoside, deren zuckerfreie Abbauprodukte und Derivate derselben

(57) Es werden neue Glycoside und deren zuckerfreie Abbauprodukte, sowie synthetisch hergestellte Derivate beschrieben, welche als Wirkstoffe von pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden können. Die neuen Glycoside sind aus den wässrigen Extrakten von Pflanzenpollen isoliert worden.

Diese neuen Glycoside, zuckerfreien Abbauprodukte und deren Derivate besitzen die Wirksamkeit, das Immunsystem von warmblütigen Tieren zu modulieren, und sie können als Wirkstoffe in pharmazeutischen Präparaten zur Behandlung von Tumoren und Viruserkrankungen eingesetzt werden.

EP 0 757 055 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 96 11 0132

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	WO 93 08799 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) * das ganze Dokument *	1	C07H17/08 A61K31/70 C07C62/32
A	DE 36 12 278 A (BRISTOL MYERS CO) * das ganze Dokument *	1	C07C62/34 C07C69/757 A61K31/19
D,A	EP 0 220 453 A (CERNITIN SA) * das ganze Dokument *	1	
A	S.CHANDRA LAHIRI ET AL.: "Synthesis and Pharmacology of Some Pyrroles and Indan Amines : Hexahydro Indeno (1,2-c) Pyrroles and Indan Amines." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, Bd. 57, Nr. 6, 1968, Seiten 1013-1016, XP002056178 * das ganze Dokument *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C07H C07C
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>18. Februar 1998</b>	
		Prüfer <b>Scott, J</b>	
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EP 0 757 055 A3 (19980303)